

**MINISTERO DELL'INDUSTRIA, DEL COMMERCIO E DELL'ARTIGIANATO**

DIREZIONE GENERALE DELLA PRODUZIONE INDUSTRIALE
UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI

**INV. IND.!**

Autenticazione di copia di documenti relativi alla domanda di brevetto per

N. MI99 A 001654

EP 00/05503

*Si dichiara che l'unita copia è conforme ai documenti originali
depositati con la domanda di brevetto sopraspecificata, i cui dati
risultano dall'accluso processo verbale di deposito*

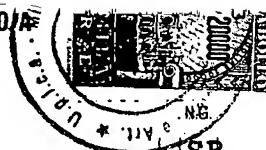
4

**PRIORITY
DOCUMENT**
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

R ma, li **14 APR 2000**

IL DIRETTORE DELLA DIVISIONE

Piero Trossi



A. RICHIEDENTE (I)

1) Denominazione ANIDRAL S.r.l. codice 01092820032
 Residenza Novara
 2) Denominazione UNIVERSITA' CATTOLICA DEL SACRO CUORE ED
 Residenza Milano codice 02133120150

B. RAPPRESENTANTE DEL RICHIEDENTE PRESSO L'U.I.B.M.

cognome nome Bianchetti Giuseppe ed altri cod. fiscale _____
 denominazione studio di appartenenza Bianchetti • Bracco • Minoja s.r.l.
 via Rossini n. 8 città Milano cap 20122 (prov) MI

C. DOMICILIO ELETTIVO destinatario

via _____ n. _____ città _____ cap _____ (prov) _____

D. TITOLO

classe proposta (sez/cl/sci) C12N gruppo/sottogruppo _____/_____/_____

"Microrganismi fago-resistenti e determinanti genetiche di fago-re-
sistenza"

ANTICIPATA ACCESSIBILITÀ AL PUBBLICO:

SI ☐ NO ☒

SE ISTANZA: DATA _____/_____/_____

N° PROTOCOLLO _____

E. INVENTORI DESIGNATI

cognome nome

cognome nome

1) Mogna Giovanni 3) Di Lorenzo Simona
 2) Strozzi Paolo 4) Bottazzi Vittorio

F. PRIORITÀ

nazione o organizzazione

tipo di priorità

numero di domanda

data di deposito

allegato
S/R

SCIoglimento RISERVE

Data

N° Protocollo

1) _____
 2) _____

G. CENTRO ABILITATO DI RACCOLTA CULTURE DI MICRORGANISMI, denominazione Belgian Coordinated Collections of Mi-
croorganisms (BCCM) (Belgio)

H. ANNOTAZIONI SPECIALI

DOCUMENTAZIONE ALLEGATA

N. es.

Doc. 1) 2 PROV n. pag. 30 riassunto con disegno principale, descrizione e rivendicazioni (obbligatorio 1 esemplare)
 Doc. 2) 2 PROV n. tav. 06 disegno (obbligatorio se citato in descrizione, 1 esemplare)
 Doc. 3) 0 RIS lettera d'incarico, procura XXXXXXXXXXXX
 Doc. 4) 0 RIS designazione inventore
 Doc. 5) 0 RIS documenti di priorità con traduzione in italiano
 Doc. 6) 0 RIS autorizzazione o atto di cessione
 Doc. 7) 0 nominativo completo del richiedente

SCIoglimento RISERVE
 Data _____ N° Protocollo _____
 confronto singole priorità

8) attestati di versamento, totale lire Cinquecentosessantacinquemila# obbligatorio

COMPILATO IL 27/07/1999

FIRMA DEL(I) RICHIEDENTE(I)

Banfi Paolo

CONTINUA SI/NO SI

DEL PRESENTE ATTO SI RICHIEDE COPIA AUTENTICA SI/NO

SI

UFFICIO PROVINCIALE IND. COMM. ART. DI

MILANO

codice 15

VERBALE DI DEPOSITO

NUMERO DI DOMANDA

MI99A 001654

Reg. A.

L'anno millenovecento

NOVANTANOVE

, il giorno

VENTISETTE

, del mese di

LUGLIO

il(i) richiedente(i) sopraindicato(i) ha(hanno) presentato a me sottoscritto la presente domanda, corredata di n.

01

folgi aggiuntivi per la concessione del brevetto sopraportato.

I. ANNOTAZIONI VARIE DELL'UFFICIALE ROGANTE

Bianchi Michele



G. RESCALI

A. RICHIEDENTE (I)

N.G.

<input type="checkbox"/>	Denominazione			<input type="checkbox"/>
	Residenza		codice	
<input type="checkbox"/>	Denominazione			<input type="checkbox"/>
	Residenza		codice	
<input type="checkbox"/>	Denominazione			<input type="checkbox"/>
	Residenza		codice	
<input type="checkbox"/>	Denominazione			<input type="checkbox"/>
	Residenza		codice	
<input type="checkbox"/>	Denominazione			<input type="checkbox"/>
	Residenza		codice	
<input type="checkbox"/>	Denominazione			<input type="checkbox"/>
	Residenza		codice	

E. INVENTORI DESIGNATI

cognome nome	cognome nome
05 Callegari Maria Luisa	
06 Morelli Lorenzo	

F. PRIORITÀ

nazione o organizzazione	tipo di priorità	numero di domanda	data di deposito	allegato S/R

SCIoglimento RISERVE	
Data	N° Protocollo

FIRMA DEL (I) RICHIEDENTE (I) **Banfi Paolo**

SPAZIO RISERVATO ALL'UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI

D. TITOLO

"Microrganismi fago-resistenti e determinanti genetiche di fago-resistenza"

L. RIASSUNTO

Si descrivono nuovi ceppi batterici, i plasmidi da questi derivati, una sequenza genica contenuta nei plasmidi codificante una proteina del sistema di resistenza fagica e un metodo per conferire resistenza fagica a colture di microrganismi.

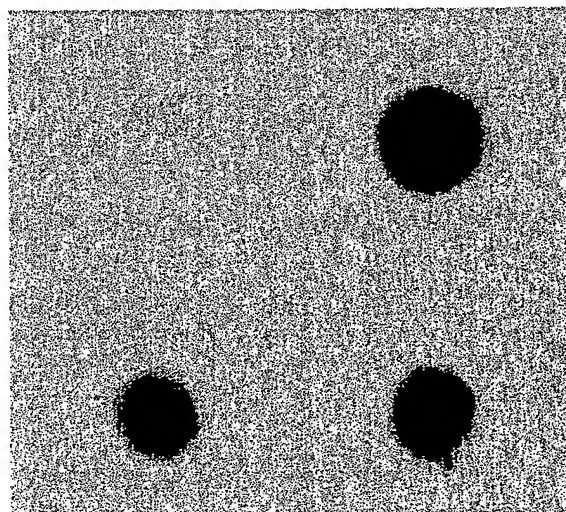


M. DISEGNO

FIGURA 1

B

A



1

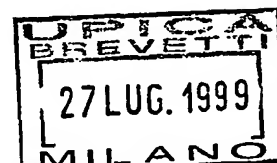
2

**"MICRORGANISMI FAGO-RESISTENTI E DETERMINANTI
GENETICHE DI FAGO-RESISTENZA"**

a nome : 1. ANIDRAL S.r.l.

2. UNIVERSITA' CATTOLICA DEL SACRO CUORE

con sede in: 1. Novara, 2. Milano



MI 99 A 001654

* *

La presente invenzione riguarda nuovi ceppi batterici, i plasmidi da questi derivati, una sequenza genica contenuta nei plasmidi codificante una proteina del sistema di resistenza fagica e un metodo per conferire tale resistenza a colture di microrganismi.

SFONDO DELL'INVENZIONE

I batteri lattici svolgono un ruolo fondamentale nel processo di produzione di differenti derivati del latte, in particolare per quanto riguarda i lattici fermentati ed i formaggi.

La loro azione si esplica già nelle prime fasi della trasformazione casearia, inducendo nel latte e/o nella cagliata caratteristiche strutturali molto diverse in funzione dell'entità e della velocità nella produzione di acido lattico, ottenuto dalla fermentazione del lattosio.

La capacità acidificante e l'attività enzimatica globale della coltura starter di batteri lattici, utilizzata in ogni specifica lavorazione casearia, rappresentano parametri tecnologici fondamentali, in grado di determinare le caratteristiche organolettiche e strutturali del prodotto finito.

Queste proprietà metaboliche sono tipiche delle diverse specie di batteri lattici e si esplicano, da un punto di vista quantitativo, con modalità diverse, in

funzione del numero, del grado di vitalità dei batteri lattici presenti nella coltura e della loro velocità di moltiplicazione nel latte e successivamente nella cagliata.

Un ritardo o peggio ancora un blocco dello sviluppo dello starter determina gravi problemi di lavorazione, compromettendo tutto il processo industriale.

Una delle cause che più frequentemente costituisce motivo di rallentamento o di blocco totale della replicazione batterica è rappresentato dalla presenza di batteriofagi, virus che si moltiplicano solo all'interno di una cellula batterica.

I batteriofagi, o fagi, sono in grado di riconoscere ed attaccare in maniera specifica la cellula ospite e, nel ciclo litico, di distruggerla totalmente, liberando alcune decine o centinaia di altri fagi virulenti in grado di attaccare altre cellule batteriche sensibili.

Il fenomeno, descritto per la prima volta nel 1935, costituisce ancora oggi uno dei problemi più gravi che affliggono l'industria casearia in quanto, quando si instaura una infezione fagica, è possibile che la produzione stessa non possa essere portata a termine, determinando ingenti danni economici.

I risultati più promettenti per la risoluzione di questo problema sono stati raggiunti utilizzando colture batteriche composte da:

- a) ceppi a differente lisotipia (sensibilità fagica) in rotazione;
- b) ceppi fago resistenti.

La prima soluzione, che al momento è la più seguita dalle società produttrici di starters, obbliga a sforzi organizzativi notevoli sia il fornitore di colture sia l'utilizzatore ed, in ogni caso, non consente una totale

standardizzazione del prodotto finito, in quanto è quasi impossibile reperire, isolare e produrre ceppi batterici con caratteristiche tecnologiche identiche ma a differente lisotipia.

La seconda soluzione può essere ottenuta con meccanismi diversi.

I ceppi fago resistenti insorgono spontaneamente all'interno di popolazioni sensibili, a seguito dell'attacco fagico.

I meccanismi di resistenza fagica evidenziati in questi ceppi si possono raggruppare in tre categorie:

1. blocco dell'assorbimento sulla parete batterica e conseguente blocco dell'iniezione del DNA fagico nel citoplasma batterico;
2. restrizione (taglio enzimatico) del DNA fagico durante l'ingresso nella cellula batterica;
3. interferenza con i meccanismi di duplicazione del DNA fagico, dopo il suo ingresso nella cellula batterica (infezione abortiva).

I mutanti spontanei fago resistenti sono però generalmente caratterizzati da una scarsa attitudine tecnologica, che li rende quindi inadatti all'impiego industriale (King W.R. *et al.*, Appl. Environ. Microbiol., 1983, 45, 1481-1485; Steenson L.R. *et al.*, J. Dairy Sci., 1986, 69, 2227-2236).

Recentemente sono state descritte invenzioni che hanno affrontato il problema di ottenere ceppi fago resistenti con elevate proprietà tecnologiche, mediante operazioni di ingegneria genetica mirate a introdurre geni codificanti per uno o più dei meccanismi sopra elencati in ceppi utilizzati come starter (brevetti US-5,824,523 e US-5,538,864).

Questo tipo di approccio pone delle limitazioni dal punto di vista della libera utilizzazione industriale, in quanto questi microrganismi e gli alimenti

ottenuti con il loro impiego ricadono, almeno per quanto riguarda le regole in atto nell'Unione Europea, nella categoria di "Novel Foods", a loro volta disciplinati dal Regolamento (CE) No. 258/97 del 127 gennaio 1997.

Riveste particolare interesse applicativo la possibilità di ottenere ceppi di colture fago resistenti mediante l'utilizzazione di tecniche naturali di trasferimento genetico.

A tal fine è necessario selezionare elementi genetici capaci di ricombinare e di mobilizzarsi in vivo e contemporaneamente conferire elevati livelli di resistenza all'attacco fagico.

DESCRIZIONE DELL'INVENZIONE

Gli autori della presente domanda hanno isolato nuovi ceppi di *Streptococcus thermophilus* che mostrano resistenza all'attacco fagico. Tali ceppi sono stati caratterizzati da un punto di vista tassonomico, tecnologico e genetico. Inoltre sono stati isolati e caratterizzati gli elementi genetici responsabili del conferimento della resistenza fagica.

Il ceppo parentale, denominato TO03 è stato depositato presso BCCMTM / Img Bacteria Collection (Gent-Belgio), al numero P-18384, mentre il suo mutante fago resistente, denominato B39, è stato depositato presso lo stesso centro di raccolta al numero P-18383. Entrambi i ceppi costituiscono un primo aspetto dell'invenzione. Tali ceppi contengono l'informazione genetica atta a conferire la fago resistenza, ma solo nel ceppo B39, in cui è avvenuta la ricombinazione genica di due plasmidi, che sono invece contenuti come molecole separate nel "wild-type", si osserva tale fago resistenza.

Il fenotipo fago resistente B39 ha, dal punto di vista dell'utilizzazione



nel settore lattiero-caseario, le stesse caratteristiche del ceppo parentale; in particolare, la velocità e l'entità dell'acidificazione in latte, sono sovrapponibili a quelle del ceppo TO03, rendendo pertanto possibile l'uso del ceppo B39 come coltura starter, nelle stesse applicazioni casearie in cui è impiegato il ceppo parentale.

Quest'ultimo, possiede due plasmidi, denominati pCRB33 e pCRB63, in cui sono stati individuate due ORF (Open Reading Frame) che presentano alta omologia con le subunità s, notoriamente coinvolte nei meccanismi di restrizione e modificazione di tipo I. Nel ceppo TO03 queste due ORF, sono inattive in quanto incomplete. I plasmidi di cui sopra, possono ricombinarsi e dare origine al plasmide pCRB96, in cui le due ORF incomplete ed inattive danno luogo, dopo il fenomeno di integrazione, ad una subunità s completa ed attiva.

I plasmidi pCRB33, pCRB63 e pCRB96 costituiscono il secondo aspetto dell'invenzione.

Tali plasmidi vengono descritti nell'esempio 1 riportato nel seguito della presente domanda. In particolare, di ciascun plasmide viene fornita la mappa di restrizione completa.

In un altro aspetto, l'invenzione si riferisce alla determinante genetica responsabile del conferimento della fago resistenza. Tale determinante corrisponde all'ORF del plasmide pCRB96, codificante per la suddetta subunità s la cui sequenza è riportata in SEQ. ID N. 1. La funzione svolta da tale proteina nei sistemi di restrizione e modificazione di tipo I è quella di dare specificità all'enzima di restrizione ed alla metilasi. La subunità da sola non ha però la capacità di conferire la fago resistenza; infatti il suo trasferimento

in un ospite eterologo, non comporta automaticamente il cambiamento del fenotipo, essendo necessaria la presenza dei geni codificanti per i due enzimi coinvolti. L'introduzione di una subunità s eterologa in un ospite che contiene un R/M completo di tipo I, può invece avere come risultato un aumento della fago resistenza paragonabile all'introduzione di un sistema R/M completo. La sola subunità s infatti, può variare la specificità del sistema, senza inibire quello preesistente. Pertanto il risultato è la somma degli effetti dell'azione delle due subunità.

La determinante genetica può essere inserita in qualsiasi plasmide idoneo, utilizzando tecniche convenzionali, per esempio come descritto in Maniatis, T. et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory (1982). L'invenzione deve dunque intendersi diretta a un plasmide contenente la determinante genetica della fago resistenza qui descritta.

I plasmidi non di tipo coniugativo, come pCRB96, possono essere utilizzati in combinazione con altri plasmidi in grado di mediarne il co-trasferimento. Pertanto, in un altro aspetto, l'invenzione si riferisce all'uso dei plasmidi contenenti la determinante genetica di fago resistenza qui descritta, da soli o in combinazione con un plasmide coniugativo, per il conferimento della fago-resistenza ad un batterio.

Un'altra caratteristica dell'invenzione riguarda un microrganismo ospite in cui un plasmide contenente la determinante genetica di fago-resistenza sia in grado di replicarsi. Il plasmide può essere introdotto nell'ospite con tecniche convenzionali, quali il trasferimento coniugativo e la trasformazione.

Oltre a *Streptococcus thermophilus*, l'ospite può essere *Bacillus subtilis*

o *Escherichia coli*, più preferibilmente *Lactococcus lactis*. L'introduzione, mediante trasformazione, della subunità s in un ospite eterologo appartenente a generi e specie diversi da *Streptococcus thermophilus* ma di pari interesse industriale, può essere ottenuto utilizzando vettori adatti all'ospite stesso.

I microrganismi contenenti i plasmidi dell'invenzione sono particolarmente utili nella produzione dei derivati del latte, come latti fermentati e formaggi. Essi vengono impiegati come colture starters, costituite da un singolo ceppo o da associazioni di ceppi.

DESCRIZIONE DETTAGLIATA DELL'INVENZIONE

Il ceppo di *Streptococcus thermophilus* TO03, impiegato come coltura starter per la produzione di formaggi freschi ed a pasta filata è risultato essere sensibile all'attacco del batteriofago litico SST3.

Il ceppo TO03 è stato caratterizzato per quanto riguarda:

- la sua posizione tassonomica, ottenuta mediante ibridazione con sonda specifica per il 23 S rRNA, secondo quanto descritto da Ehmann *et al.*, 1992 (Fig. 1);
- il profilo di fermentazione degli zuccheri, ottenuto mediante gallerie API, e risultato positivo a glucosio, fruttosio, lattosio e saccarosio (Fig. 2);
- la capacità acidificante in latte magro sterile a 37°C determinata mediante rilevazione continua del pH (Fig. 3);
- il contenuto in DNA extra-cromosomico o plasmidi che sono risultati essere in numero di due e di dimensioni di 3,3 e 6,3 kb, denominati rispettivamente pCRB33 e pCRB63 (Fig. 4).

Il ceppo TO03 è stato attaccato con il fago litico SST3, in una

proporzione fago/cellule batteriche di 1:10 (m.o.i. 0,1). Le cellule sopravvissute sono state seminate su terreno M17 agar. Le piastre sono state quindi incubate in anaerobiosi a 42°C per una notte. Questa procedura ha portato ad evidenziare circa 40 colonie della popolazione batterica originale, costituita da 10⁹ CFU/ml. Le colonie isolate sono state testate ulteriormente per la resistenza al fago.

Anche gli isolati fago resistenti così ottenuti, sono stati caratterizzati per il profilo di fermentazione degli zuccheri, la capacità acidificante in latte ed il contenuto in DNA extra-cromosomico.

Per quanto riguarda quest'ultimo aspetto, gli isolati fago resistenti si potevano dividere in due gruppi:

- Gruppo denominato R1 costituito da isolati contenenti i due plasmidi pCRB33, pCRB63 ed il plasmide aggiuntivo pCRB96.
- Gruppo denominato R2 costituito da isolati contenenti il plasmide pCRB33 ed il plasmide aggiuntivo pCRB96.

Tutti gli isolati risultavano essere tassonomicamente identici al ceppo parentale, mostravano lo stesso profilo di fermentazione degli zuccheri, ma crescevano più lentamente in latte, rendendoli di scarsa utilità tecnologica.

Un isolato del gruppo R2 è stato in seguito fatto crescere, in M17 liquido, a 30°C, temperatura inferiore a quella ottimale. La popolazione batterica ottenuta in queste condizioni è stata seminata su terreno agarizzato e nuovamente sottoposta ad attacco fagico.

Le UFC che si erano mostrate stabilmente resistenti al fago, circa il 50% degli isolati, sono state quindi nuovamente testate per valutare la velocità di acidificazione in latte; sorprendentemente si è visto che una di queste colonie,



denominata B39, aveva una pari velocità di acidificazione se confrontata con quella del ceppo parentale (Fig.3).

L'analisi del profilo plasmidico di questo ceppo ha dimostrato la presenza del solo plasmide di 9,6 Kb, denominato pCRB96.

Per studiare il coinvolgimento del plasmide pCRB96 nella fago resistenza, si è proceduto al curing del plasmide stesso. Il clone ottenuto chiamato C48, era privo di plasmidi e sensibile al fago SST3.

Per avere un'ulteriore conferma del ruolo svolto da questo plasmide, si è proceduto a reintrodurlo per coniugazione nel clone C48.

Il clone C48 aveva però le stesse caratteristiche fenotipiche del ceppo B39 rendendo così impossibile discriminare, dopo l'evento di coniugazione, i donatori dai riceventi. Per ovviare a questo inconveniente si è provveduto alla selezione di un clone, a partire dal C48, resistente all'acido fusidico.

Il ceppo C48 è stato irradiato con i raggi UV e le cellule sopravvissute sono state seminate in piastre di M17 agar, contenenti acido fusidico. Lo scopo era quello di selezionare un mutante resistente a questo antibiotico al fine di utilizzarlo come selettore dei riceventi dopo coniugazione.

Il clone ottenuto è stato chiamato TO60.

Le radiazioni UV non avevano alterato il clone per quanto riguardava la sensibilità al fago SST3. Poiché il plasmide pCRB96 non è di tipo coniugativo, si doveva ottenere un co-trasferimento del plasmide stesso mediato da $pAM\beta_1$. Questo plasmide è coniugativo e codifica per la resistenza all'eritromicina. I successivi passaggi, per ottenere il trasferimento del plasmide, sono schematizzati in Fig. 5 e possono essere così riassunti:

- attraverso una prima coniugazione si è trasferito il plasmide $pAM\beta_1$ dal

ceppo donatore *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* SH4174, al clone B39.

Le colonie di tale ceppo donatore erano contaminate in piastre di M17, contenenti glucosio ed eritromicina, ed incubate a 30°C in aerobiosi. Le colonie dei transconiugati erano selezionate su piastre di M17 contenente lattosio ed eritromicina e incubate a 42°C in anaerobiosi;

- in un secondo evento coniugativo si è utilizzato il clone B39 (contenente pAM β_1) come ceppo donatore e il clone TO60 come ricevente. I transconiugati attesi, in questo caso, erano resistenti all'eritromicina ma anche all'acido fusidico. Tutte le colonie con queste caratteristiche sono state testate per la resistenza al fago.

Alcune di queste (11 su un totale di 350 colonie testate) si sono dimostrate fago resistenti. Il contenuto plasmidico di questi cloni ha dimostrato la contemporanea presenza del plasmide pAM β_1 e pCRB96.

Gli esperimenti di curing e il trasferimento del plasmide pCRB96 hanno così permesso di dimostrare che la fago resistenza dei cloni isolati a partire dal ceppo TO03 era legata alla presenza di questo plasmide.

I cloni fago resistenti non mostravano nei confronti del fago SST3 una resistenza completa, ma il numero di placche fagiche ottenute in piastra era ridotto rispetto al numero di PFU ottenute con il ceppo TO03 di almeno 2 log. Per identificare il tipo di resistenza fagica coinvolta si è provveduto a titolazioni incrociate utilizzando il fago SST3 moltiplicato sul ceppo TO03 e lo stesso fago propagato sul ceppo B39.

Quest'ultimo fago è stato chiamato per comodità fago SST39.

Come è mostrato in tabella 1 il fago titolato sul ceppo sensibile, possedeva un titolo superiore rispetto a quello ottenuto quando il ceppo ospite

era il B39. Il fago moltiplicato sul ceppo B39 invece produceva lo stesso numero di PFU/ml quando titolato sui due ceppi.

Tabella 1

Ceppo ospite	FAGO SST3	FAGO SST39
	PFU/ml	PFU/ml
TO03	2×10^8	3×10^7
B39	3×10^6	3×10^7
C48	2×10^8	3×10^7

In tabella 2 sono schematizzati i risultati delle titolazioni ottenute sui ceppi sensibili e sul ceppo fago resistente rispettivamente con il fago SST39 propagato su TO03 e B39. E' possibile vedere come la capacità di attaccare con un'efficienza elevata il ceppo fago resistente viene persa dal fago SST39 dopo essere stato propagato sul ceppo TO03. Questo comportamento è classico di sistemi di restrizione e modificazione. Si è quindi attribuito al plasmide pCRB96 un coinvolgimento in un sistema R/M.

Tabella 2

Ceppo ospite	FAGO SST39/TO03	FAGO SST39/B39
	PFU/ml	PFU/ml
TO03	2×10^7	3×10^8
B39	3×10^5	3×10^8
C48	2×10^7	3×10^8

Analisi del DNA plasmidico

L'analisi delle mappe di restrizione dei plasmidi pCRB33, pCRB63 e pCRB96 suggeriva come quest'ultimo potesse essere il risultato dell'integrazione dei due plasmidi presenti originariamente nel ceppo fago sensibile TO03. Le prime conferme si sono ottenute con esperimenti di ibridazione DNA/DNA. Con quest'ultimo metodo, infatti, si ottenevano segnali quando il plasmide pCRB96 era ibridato con sonde costituite da frammenti di pCRB33 e pCRB63.

Per ottenere ulteriori prove del fenomeno d'integrazione si è provveduto al clonaggio e al sequenziamento del plasmide pCRB33. La rappresentazione grafica del plasmide è mostrata in Fig. 6. Dall'analisi della sequenza si sono potute localizzare due ORF complete rispettivamente indicate in fig. 6 come ORF1 e ORF2.

L'ORF2 mostrava un'alta omologia (87%) con la sequenza della proteina RepA, localizzata sul plasmide pST1 del ceppo di *Streptococcus thermophilus* ST (numero di deposito GENE BANK X65856). A valle della regione codificante è stata trovata una regione di terminazione, costituita da sequenze ripetute omologhe all'86% a quelle di RepA sopracitata. L'ORF1, presenta omologia in alcune sue parti con numerose subunità s di sistemi di restrizione e modificazione di tipo I.

Le omologie più forti sono state riscontrate in una regione di 133 bp, la cui sequenza contiene uno dei due motivi conservati dalle subunità s. La stessa omologia con le subunità s è stata trovata anche in una regione di 153 bp localizzata all'esterno dell'ORF1 e distante 473 bp dalla fine della prima regione. Queste due zone possono essere considerate due sequenze ripetute dirette. La prima di 133 bp è stata da noi chiamata DR1 mentre la seconda, di



Utilizzando un set di primers disegnati sulla sequenza delle due DR trovate in pCRB33, è stato possibile amplificare, mediante reazione a catena della polimerasi o PCR, il plasmide pCRB96. Il prodotto d'amplificazione era costituito da due frammenti di 3,3 e 6,3 kb rispettivamente. Questo risultato ha fatto ipotizzare che le due DR fossero localizzate nella regione interessata dall'integrazione.

Riassumendo pCRB33 porta un gene che codifica per la proteina responsabile della sua replicazione e presenta due DR probabilmente coinvolte nel fenomeno di integrazione.

Si è quindi sottoposto il plasmide pCRB63, a clonaggio e a determinazione della sequenza nucleotidica. L'analisi della sequenza ottenuta, non mostrava alcuna omologia con geni noti codificanti meccanismi di fago resistenza tranne per l'ORF1, la cui sequenza presentava regioni con forte omologia nei confronti di diverse subunità s di sistemi di restrizione e modificazione di tipo I, esattamente come riscontrato in precedenza per l'ORF1 del plasmide pCRB33. L'omologia riscontrata riguardava, comunque, anche in questo caso i motivi conservati delle subunità s. Infatti anche nel plasmide pCRB63 sono presenti le due DR, esattamente come per il pCRB33.

Il plasmide pCRB96 è stato quindi interamente sequenziato e dai dati ottenuti è risultato essere un cointegrato dei plasmidi pCRB33 e pCRB63.

Le due regioni in cui avviene l'integrazione sono quelle delimitate dalle due DR, mentre la regione che le separa è quella in cui i due plasmidi si tagliano e si uniscono. In pCRB96 infatti si trovano 2 regioni in cui sono presenti DR1 e DR2. La DR1 del pCRB33 è, in questo caso, associata alla

DR2 del pCRB63, mentre la DR2 del plasmide più piccolo è associata alla DR1 di pCRB63.

In una delle regioni d'integrazione è stata localizzata l'ORF1 (Fig. 3) che presenta una forte omologia con le subunità s di sistemi R/M di tipo I, in particolare con la subunità s isolata da *Lactococcus lactis* IL1403 e la subunità s di *LldI* di *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* (numero di deposito GENE BANK AF 034786 e U90222) verso le quali è stata riscontrata una omologia del 55%. Nel caso di pCRB96 l'analisi della sequenza, le omologie riscontrate ed i risultati fenotipici dimostrano che il gene codificante per la subunità s è completo e funzionale.

pCRB33 e pCRB63, al contrario, contengono ORF che presentano omologie con geni codificanti le subunità s di sistemi R/M di tipo I, ma incomplete e quindi non funzionali. Solo pCRB96 grazie all'integrazione possiede il gene funzionale, la cui sequenza risulta essere la somma di parti di ORF1 di pCRB33 e di ORF1 di pCRB63. La sequenza dell'intera subunità s di pCRB96 è riportata in Seq ID No 1. Sulla sequenza della subunità s di pCRB96 è stata evidenziata, sottolineandola, la parte di sequenza derivante dal pCRB33.

BREVE DESCRIZIONE DELLE FIGURE

Figura 1: Identificazione tassonomica dei ceppi TO03 e B39.

Sonda utilizzata: CATGCCTTCGCTTACGCT

Sonda e procedura di ibridazione secondo Ehrmann et al. (1992)

"Species-specific oligonucleotide probe for the identification of *Streptococcus thermophilus*", Systematic and Applied Microbiology, 15, 453-455.

Risultati dell'ibridazione:

A1: Ceppo Tipo della specie *Streptococcus thermophilus* DSM 20617 (controllo positivo);

A2: DNA estratto da *Lactobacillus helveticus* ATCC 15009 (controllo negativo);

B1: DNA estratto da *Streptococcus thermophilus* B39;

B2: DNA estratto da *Streptococcus thermophilus* TO03.

I segnali positivi sono stati ottenuti dal ceppo di riferimento DSM 20617 e dai ceppi in esame TO03 e B39, che confermano così la loro appartenenza alla specie *Streptococcus thermophilus*.

Figura 2: profilo fermentativo del ceppo di *Streptococcus thermophilus* TO03. Risultano positivi il glucosio (11), il fruttosio (12), il lattosio (29) e il saccarosio (31).

Figura 3: Curve di acidificazione: inoculo 1%, latte magro sterile, 37°C.

Figura 4: Profilo plasmidico del ceppo TO03 (pozzetto 2) e del ceppo B39 (pozzetto 4).

Figura 5: Schema delle coniugazione effettuate per ottenere il cotrasferimento di pAM β 1 e del plasmide pCRB96.

Figura 6: Rappresentazione schematica di pCRB33.

ORF1: ORF localizzata dal nt 411 al nt 1308, pari a 299 amminoacidi, della sequenza nucleotidica di pCRB33 allegata. Questa ORF ha omologia con diverse subunità di sistemi di restrizione di tipo I.

ORF2: ORF localizzata dal nt 2070 al nt 2960. Questa ORF ha un'omologia dell'87% con la RepA di pST1 (acc. num. X65856).

Gli esempi che seguono illustrano l'invenzione in maggior dettaglio.

ESEMPIO 1

Caratterizzazione dei plasmidi pCRB33, pCRB63 e pCRB96.

Nelle seguenti tabelle vengono riportati i profili di restrizione dei plasmidi pCRB33, pCRB63 e pCRB96.



Tabella 3: plasmide pCRB33, di 3375 paia di basi:

Nome enzima	No. tagli	Posizione dei siti	Sequenza di riconoscimento
AccI	1	1233	gt/mkac
AluI	13	134 138 161 466 622 1137 1670 1714 2259 2421 2745 2932 2982	ag/ct
AseI	1	2055	at/taat
AsnI	1	2055	at/taat
AvaII	3	2199 2213 2227	g/gwcc
DdeI	8	157 1144 1215 1671 1695 2159 2203 2255	c/tnag
DpnI	2	985 2253	ga/tc
DraI	2	2828 3024	tta/aaa
EcoRI	2	39 1804	g/aattc
EcoRV	1	636	gat/atc
FokI	1	259	ggatg
HaeIII	4	2157 2173 3092 3275	gg/cc
HindIII	3	1712 2257 2743	a/agctt
HinfI	5	1223 1697 2006 2102 2341	g/antc
HpaII	2	202 2174	c/cgg
KpnI	1	1565	ggtac/c
MaeI	11	135 139 669 733 784 1877 2848 2854 3084 3269 3277	c/tag
MaeII	7	1081 1201 1468 2887 3049 3174 3306	a/cgt

MaeIII	8	712 1082 1177 1752 2499 2872 3045 3307	/gtnac
MboI	2	983 2251	/gatc
MseI	23	8 167 237 243 287 335 358 518 616 1095 1329 1904 1996 2055 2195 2378 2447 2636 2741 2827 2965 3023 3180	t/taa
NotI	1	3090	gc/ggccgc
PstI	1	3101	ctgca/g
PvuII	1	2421	cag/ctg
Sau3AI	2	983 2251	/gatc
Sau96I	3	2199 2213 2227	g/gncc
SpeI	2	1876 3083	a/ctagt
TaqI	12	1 632 638 763 1254 1735 1849 2004 2111 2985 3104 3372	t/cga
XbaI	1	732	t/ctaga

dove:

r = a oppure g; **k** = g oppure t; **h** = a oppure c oppure t; **d** = a oppure g oppure t; **y** = c oppure t; **s** = c oppure g; **b** = c oppure g oppure t; **n** = a oppure c oppure g oppure t; **m** = a oppure c; **w** = a oppure t; **v** = a oppure c oppure g.

Le seguenti endonucleasi non tagliano la sequenza di pCRB33:

Apal, Aval, **BamHI**, BclI, BglI, CfoI, ClaI, HaeII, HincII, HindII, HpaI, NcoI, PvuI, **SacI**, SacII, SalI, **SmaI**, SphI, **XhoI**, XmaI.

Tabella 4: plasmide pCRB63, di 6148 paia di basi:

Nome enzima	No. tagli	Posizione dei siti	Sequenza di riconoscimento
AccI	4	165 312 2451 4102	gt/mkac
AluI	20	692 850 1358 1487 1518 1965 2264 2270 2471 2625 2913 3155 3667 3717 3744 3793 4038 4270 4648 5530	ag/ct
AseI	2	81 5115	at/taat
AsnI	2	81 5115	at/taat
AvaI	1	2702	c/ycgrg
AvaII	2	200 4368	g/gwcc
CfoI	8	1203 1897 2046 2609 2909 4097 4442 4483	gcg/c
ClaI	2	276 322	at/cgat
DdeI	11	61 120 346 1930 2130 3953 4251 4276 4581 5002 5904	c/tnag
DpnI	7	363 1029 1067 4890 5032 5718 5917	ga/tc
DraI	5	922 2773 4304 5261 5483	tta/aaa
EcoRI	2	1569 3413	g/aattc
EcoRV	2	274 2510	gat/atc
FokI	6	3875 3905 3911 4961 5500 5565	ggatg
HaeII	2	1898 4098	rgcgc/y
HaeIII	3	2189 3001 5891	gg/cc
HincII	2	2452 3706	gty/rac
HindII	2	2452 3706	gty/rac
HindIII	1	2623	a/agctt
HinfI	12	124 324 344 380 612 1434 2146 2453 3955 4255 5355 5448	g/antc
HpaII	3	194 3396 5812	c/cgg
KpnI	1	580	ggtac/c

MaeI	16	609 1580 1916 2271 2540 2721 2910 3597 4079 4122 4184 4622 4985 5231 5272 5945	c/tag
MaeII	19	88 211 355 877 1529 2092 2318 2545 2827 2877 3283 3349 3367 3624 3686 3887 3987 4192 6016	a/cgt
MaeIII	12	240 341 1094 1260 2011 2273 2878 3350 3590 4056 4773 5379	/gtnac
MboI	7	361 1027 1065 4888 5030 5716 5915	/gatc
MseI	44	81 99 147 207 375 921 1062 1151 1481 2219 2410 2711 2772 3020 3092 3204 3221 3443 3491 3544 3644 3694 3750 3825 3937 3993 4003 4141 4229 4303 4407 4530 4550 4750 4847 5015 5115 5260 5455 5482 5548 5626 5630 5666	t/taa
PvuI	1	364	cgat/cg
SacI	1	3795	gagct/c
SacII	1	2020	ccgc/gg
Sall	1	2450	g/tcgac
Sau3AI	7	361 1027 1065 4888 5030 5716 5915	/gatc
Sau96I	3	200 4368 5889	g/gncc
SpeI	1	4183	a/ctagt
SphI	1	5743	gcatg/c
TaqI	13	276 322 2377 2451 2465 2473 2620 2808 2866 3377 3726 4666 5921	t/cga
XbaI	4	608 2720 4078 4121	t/ctaga



r = a oppure g; k = g oppure t; h = a oppure c oppure t; d = a oppure g oppure t; y =
c oppure t; s = c oppure g; b = c oppure g oppure t; n = a oppure c oppure g oppure
t; m = a oppure c; w = a oppure t; v = a oppure c oppure g.

Le seguenti endonucleasi non tagliano la sequenza di pCRB63:

ApaI, BamHI, BclI, BglI, HpaI, NcoI, PstI, PvuII, SmaI, XhoI, XmaI.

Tabella 5: plasmide pCRB96, di 9515 paia di basi:

Nome enzima	No. tagli	Posizione dei siti	Sequenza di riconoscimento
AccI	5	1150 1297 3436 5087 7381	gt/mkac
AluI	33	134 138 161 466 622 1677 1835 2343 2472 2503 2950 3249 3255 3456 3610 3898 4140 4652 4702 4729 4778 5023 5255 5633 6515 7284 7815 7859 8402 8564 8888 9072 9122	ag/ct
AseI	3	1066 6100 8200	at/taat
AsnI	3	1066 6100 8200	at/taat
AvaI	1	3687	c/ycgrg
AvaII	5	1185 5353 8342 8356 8370	g/gwcc
CfoI	8	2188 2882 3031 3594 3894 5082 5427 5468	gcg/c
ClaI	2	1261 1307	at/cgat
DdeI	18	157 1046 1105 1331 2915 3115 4938 5236 5261 5566 5987 6889 7363 7816 7840 8302 8346 8398	c/tnag
DpnI	9	1348 2014 2052 5875 6017 6703 6902 7132 8396	ga/tc
DraI	7	1907 3758 5289 6246 6468 8969 9164	ttt/aaa
EcoRI	4	39 2554 4398 7949	g/aattc
EcoRV	3	636 1259 3495	gat/atc
FokI	7	259 4860 4890 4896 5946 6485 6550	ggatg

HaeII	2	2883 5083	rgcgc/y
HaeIII	7	3174 3986 6876 8300 8316 9232 9415	gg/cc
HincII	2	3437 4691	gty/rac
HindII	2	3437 4691	gty/rac
HindIII	4	3608 7857 8400 8886	a/agctt
Hinfl	17	1109 1309 1329 1365 1597 2419 3131 3438 4940 5240 6340 6433 7371 7842 8151 8245 8484	g/antc
HpaII	5	202 1179 4381 6797 8317	c/cgg
KpnI	2	1565 7710	ggtac/c
MaeI	27	135 139 669 733 784 1594 2565 2901 3256 3525 3706 3895 4582 5064 5107 5169 5607 5970 6216 6257 6930 8022 8988 8994 9224 9409 9417	c/tag
MaeII	26	1073 1196 1340 1862 2514 3077 3303 3530 3812 3862 4268 4334 4352 4609 4671 4872 4972 5177 7001 7228 7349 7614 9027 9189 9314 9446	a/cgt
MaeIII	21	712 1225 1326 2079 2245 2996 3258 3863 4335 4575 5041 5758 6364 7229 7325 7897 8415 8642 9012 9185 9447	/gtnac
MboI	9	1346 2012 2050 5873 6015 6701 6900 7130 8394	/gatc
MseI	68	8 167 237 243 287 335 358 518 616 1066 1084 1132 1192 1360 1906 2047 2136 2466 3204 3395 3696 3757 4005 4077 4189 4206 4428 4476 4529 4629 4679 4735 4810 4922 4978 4988 5126 5214 5288 5392 5515 5535 5735 5832 6000 6100 6245 6440 6467 6533	t/taa

6611 6615 6651 7242 7291 7475
8049 8141 8200 8338 8521 8590
8779 8884 8968 9105 9163 9320

NotI	1	9230	gc/ggccgc
PstI	1	9241	ctgca/g
PvuI	1	1349	cgat/cg
PvuII	1	8564	cag/ctg
SacI	1	4780	gagct/c
SacII	1	3005	ccgc/gg
SalI	1	3435	g/tcgac
Sau3AI	9	1346 2012 2050 5873 6015 6701 6900 7130 8394	/gatc
Sau96I	6	1185 5353 6874 8342 8356 8370	g/gncc
SpeI	3	5168 8021 9223	a/ctagt
SphI	1	6728	gcatg/c
TaqI	23	1 638 1261 1307 3362 3436 3450 3458 3605 3793 3851 4362 4711 5651 6906 7402 7880 7994 8149 8254 9125 9244 9512	t/cga
XbaI	5	732 1593 3705 5063 5106	t/ctaga

r = a oppure g; k = g oppure t; h = a oppure c oppure t; d = a oppure g oppure t; y =
c oppure t; s = c oppure g; b = c oppure g oppure t; n = a oppure c oppure g oppure
t; m = a oppure c; w = a oppure t; v = a oppure c oppure g.

Le seguenti endonucleasi non tagliano la sequenza di pCRB96:

ApaI, BamHI, BclI, BglI, HpaI, NcoI, SmaI, XhoI, XmaI.

ESEMPIO 2

Trasferimenti coniugativi.

Si fanno sviluppare

1. per il primo ciclo di coniugazione le colture del ceppo donatore di *Lactococcus lactis* SH4174 contenente il plasmide pAM β 1, che codifica per l'eritromicina resistenza, e di quelle ricevente di *Streptococcus thermophilus* B39, contenente il plasmide pCRB 96 alle temperature e nelle condizioni ottimali di crescita per 12 ore.
2. Per il secondo ciclo di coniugazione, le colture del ceppo donatore di *Streptococcus thermophilus* B39 (pAM β 1) contenente il plasmide pAM β 1 ed il plasmide pCRB 96, e di quelle ricevente di *Streptococcus thermophilus* TO60, privo di plasmidi e resistente all'antibiotico acido fusidico.

Procedura

Da entrambe le colture vengono prelevati e miscelati tra loro volumi uguali.

Da questa miscela vengono prelevati 0,2 ml, posti su una piastra Petri contenente terreno M17 senza alcun agente di selezione, spatolati omogeneamente e incubati per un periodo variabile da 6 a 30 ore.

Le cellule batteriche cresciute su questo terreno vengono raccolte con 1 ml di soluzione fisiologica e quindi si procede alla semina in piastra delle appropriate diluizioni decimali, in terreni colturali (vedi tabella) appropriati per ottenere la selezione dei ceppi donatori, riceventi e degli eventuali transconiugati presenti nella miscela di coniugazione.

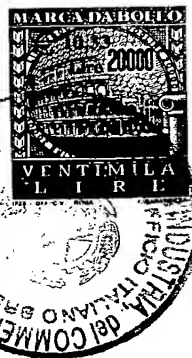


Tabella 6: Primo ciclo di coniugazione.

	CEPPI	SELEZIONE
DONATORI	SH4174	30°C, 50 µg/ml eritromicina, terreno M17 glucosato
RICEVENTI	B39 (pCRB96)	42°C, terreno M17 lattosato
TRANSCONIUGATI	B39 (pCRB96-pAMβ1)	42°C, terreno M17 lattosato, 10 µg/ml eritromicina

Tabella 7: Secondo ciclo di coniugazione.

	CEPPI	SELEZIONE
DONATORI	B39(pCRB96-pAMβ1)	42°C, terreno M17 lattosato, 10 µg/ml eritromicina
RICEVENTI	TO60	42°C, terreno M17 lattosato, 10 µg/ml acido fusidico
TRANSCONIUGATI	TO60 (pCRB96-pAMβ1)	42°C, terreno M17 lattosato, 10 µg/ml eritromicina, 10 µg/ml acido fusidico

Dal secondo ciclo di coniugazione si attendono due tipi di transconiuganti: uno contenente il solo plasmide coniugativo pAMβ1 ed un secondo contenente entrambi i plasmidi pCRB96 e pAMβ1.

Risultati.

Tabella 8: Primo ciclo di coniugazione.

	CEPPI	Unità Formanti Colonia
DONATORI	SH4174	10 ⁷
RICEVENTI	B39 (pCRB96)	10 ⁹
TRANSCONIUGATI	B39 (pCRB96-pAMβ1)	1000

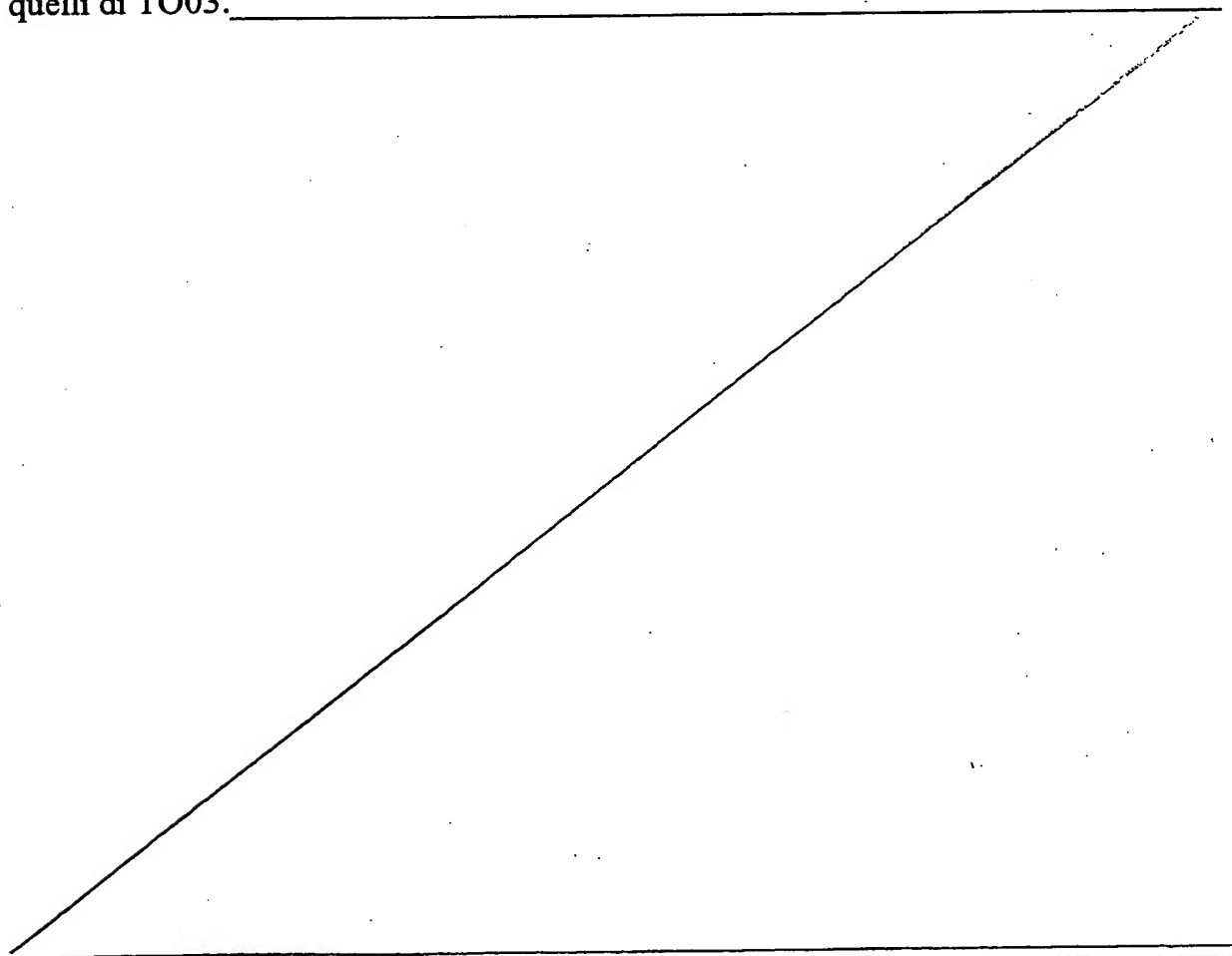
Tabella 9: Secondo ciclo di coniugazione.

	CEPPI	SELEZIONE
DONATORI	B39(pCRB96-pAM β 1)	10 ⁸
RICEVENTI	TO60	10 ⁸
TRANSCONIUGATI	TO60 (pAM β 1) TO60 (pCRB96-pAM β 1)	10 ⁴ (pAMB1) 50 (pCRB96-pAM β 1)

Nel secondo ciclo di coniugazione solo 50 Unità Formanti Colonia erano state oggetti di comobilizzazione del plasmide pCRB96 da parte del plasmide pAM β 1.

I livelli di resistenza fagica dei transconiuganti TO60 (pCRB96-pAM β 1) erano identici a quelli di B39.

I livelli di sensibilità fagica di TO60 e di TO60 (pAM β 1) erano identici a quelli di TO03.



LISTA DI SEQUENZA

<110> ANIDRAL S.r.l. - UNIVERSITA' CATTOLICA DEL SACRO CUORE
 <120> Microrganismi fago-resistenti e determinanti genetiche di fago-resistenza
 <130>
 <140>
 <141>
 <160> 1
 <170> PatentIn Ver. 2.1
 <210> 1
 <211> 1111
 <212> DNA
 <213> Streptococcus thermophilus
 <400> 1

atggtgaagg	taaatttatt	acttacatgg	aatgtattca	gtaatcctgt	agctgattta	60
gatggacttg	aaagtgtaga	aattgataat	aaacagtttc	aggttaaggc	tggagatggt	120
ctatttacta	cttcatcaga	aactccagaa	gaagttggaa	tgatcatctat	gtggcttgga	180
aatgcagaca	atatctatct	taatagcttt	tgttttggat	atcgaccaac	tattgaattt	240
gataaatatt	atctagcggg	catggtgagg	tctgctccaa	ttagaaagaa	atttcagtta	300
cttacacaag	gaattttctag	atataacatt	tcaaagaata	aagttatgga	aatgtctatt	360
cctgttccta	gcattgaaga	acaagaatta	cttggagcat	ttttcaacaa	cctcaatcaa	420
accatcgctc	ttcatcagcg	taagttagat	ttgttgaaag	agcagaaaaa	aggcttttta	480
caaaaaatgt	tccctaaaaa	tggtgccaaa	gttcctgaat	tgcgatttgc	ggggtttgct	540
gacgattggg	aagagcgtaa	gttgggagat	atttcctata	aggtaaaga	aaaaaataaa	600
actggtgagt	ttacagaaac	tttgaccaac	tcagcagaat	atggaattat	taatcaacgt	660
gattttttta	ataaagatat	ttctaacgct	aagaatctta	ctggctatta	tgtagttaaa	720
aacgatgatt	ttgtatacaa	tctcgtatt	tcaaattttg	ctccggttgg	accaattaaa	780
cgtaataaat	taggtagaac	tggcgtaatg	tcaccactat	attatgtttt	ccgtacacat	840
gatatcgata	aaaattacct	tgagaagtat	tttgatactg	tctactggca	tcgattcatg	900
aaactaaacg	gtgactcagg	agtacgtgcc	gatcgttttg	caattaagga	ctctgtcttt	960
ggtgaaatgc	caatttcctta	tccaacgatt	gaagaacaag	aaaaaatagg	ttcattcttc	1020
aaacagttag	acgatactat	cgctcttcat	cagcgtaagt	tagattttgt	gaaagagcag	1080
aaaaaaggct	ttttacaaaa	gatgtttggt	t			1111

RIVENDICAZIONI

1. Ceppi di *Streptococcus thermophilus* depositati presso BCCM/LMG (Gent, Belgio) ai numeri P-18383 e P-18384.
2. Molecola di acido nucleico avente la sequenza riportata in Seq ID No. 1.
3. Plasmide contenente la molecola di acido nucleico della rivendicazione 2.
4. Plasmide pCRB33, ottenibile da una coltura del ceppo di *Streptococcus thermophilus* N. P-18384 come rivendicato nella rivendicazione 1, avente una lunghezza di 3375 paia di basi ed un unico sito di restrizione per ciascuna delle endonucleasi AccI, AseI, AsnI, EcoRV, FokI, NotI, PstI, PvuII, XbaI.
5. Plasmide pCRB63, ottenibile da una coltura del ceppo di *Streptococcus thermophilus* N. P-18384 come rivendicato nella rivendicazione 1, avente una lunghezza di 6184 paia di basi ed un unico sito di restrizione per ciascuna delle endonucleasi AvaI, HindIII, KpnI, PvuI, SacI, SacII, SalI, SpeI, SphI.
6. Plasmide pCRB96, ottenibile da una coltura del ceppo di *Streptococcus thermophilus* N. P-18383 come rivendicato nella rivendicazione 1, avente una lunghezza di 9515 paia di basi ed un unico sito di restrizione per ciascuna delle endonucleasi AvaI, NotI, PstI, PvuI, PvuII, SacI, SacII, SalI, SphI.
7. Microrganismo contenente un plasmide delle rivendicazioni 3-6.
8. Microrganismo secondo la rivendicazione 7, scelto tra *Streptococcus thermophilus*, *Lactococcus lactis*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*.
9. Coltura starter in grado di fermentare il latte comprendente un microrganismo delle rivendicazioni 1, 7 o 8.
10. Uso di un plasmide delle rivendicazioni 3-6 da solo o in combinazione



con un plasmide coniugativo, per il conferimento della fago-resistenza ad un batterio.

Milano, 27 luglio 1999

Il Mandatario
(Banfi Paolo)
di Bianchetti • Bracco Minoja S.r.l.

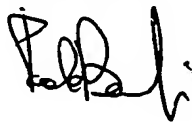
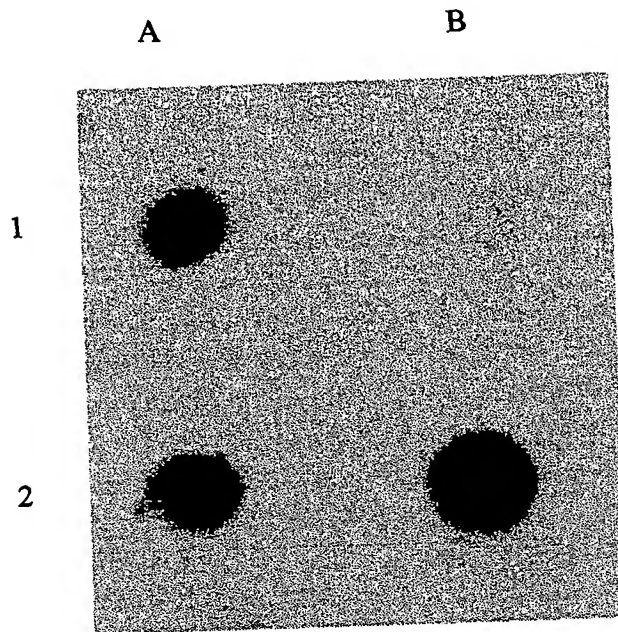


FIGURA 1

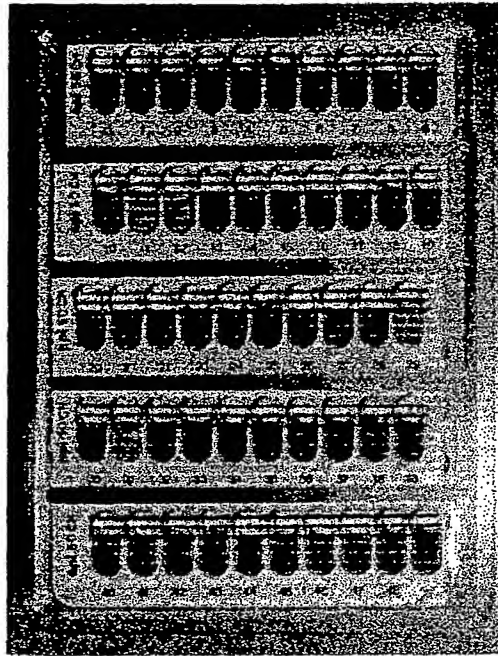


Il Mandatario
(Banfi Paolo)
di Bianchetti • Bracco • Minoja S.r.l.

MI 99 A 001654



FIGURA 2



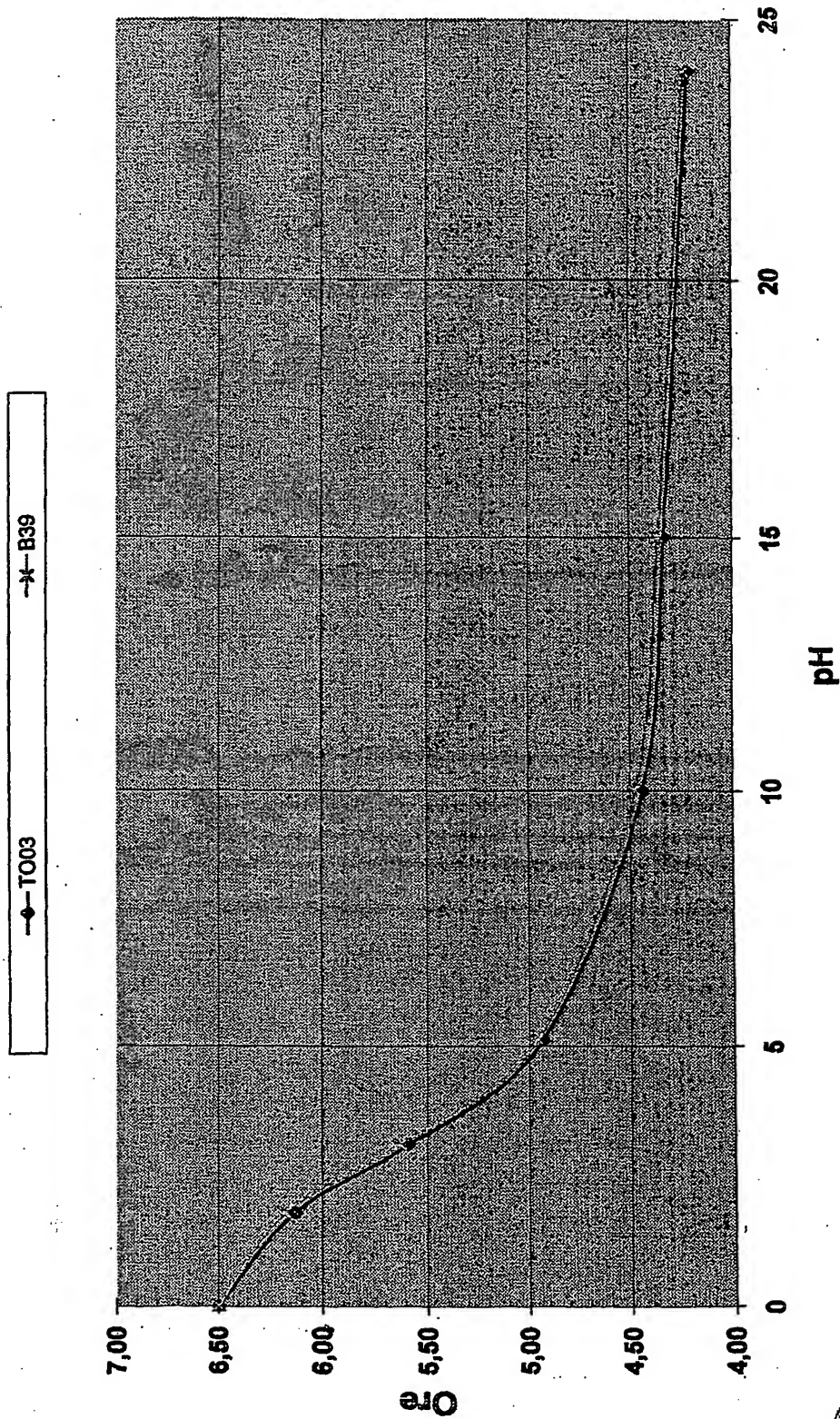
Il Mandatario
(Banfi Paolo)
di Bianchetti • Bracco • Minoja S.r.l.

Handwritten signature of Paolo Banfi

MI 99 A 001804

Handwritten signature
Circular stamp with text: "MILANO 1999" and "A 001804"

FIGURA 3

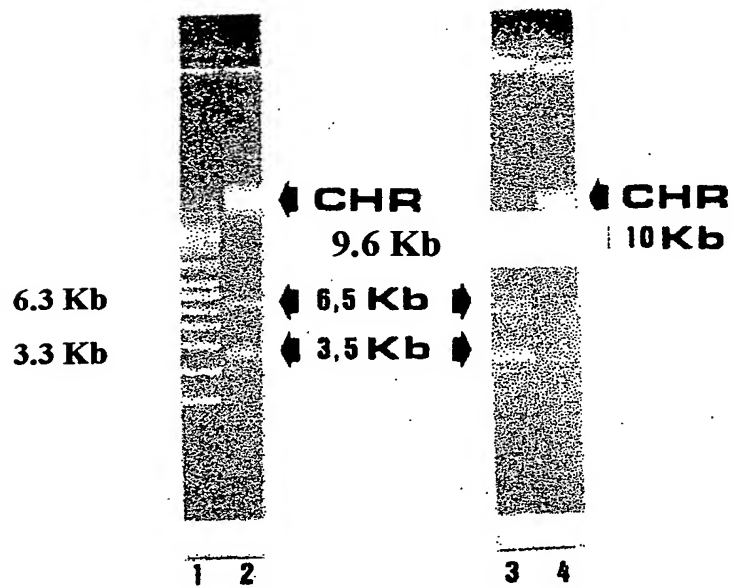


Il Mandatario
(Banfi Paolo)
di Bianchetti • Bracco Minoja S.r.l.

Handwritten signature



FIGURA 4

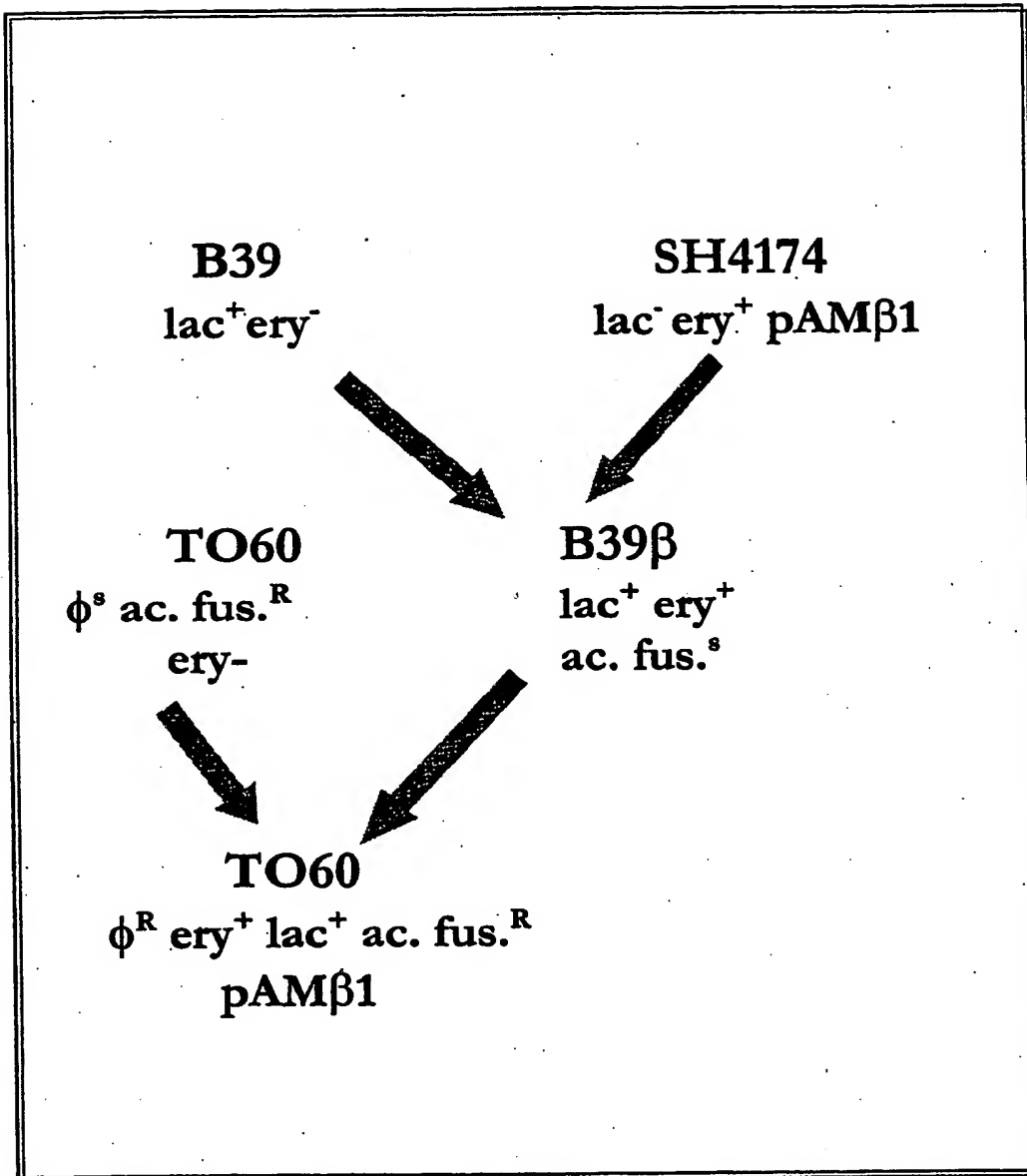


Il Mandatario
(Banfi Paolo)
di Bianchetti • Bracco • Minoja S.r.l.

[Handwritten signature]

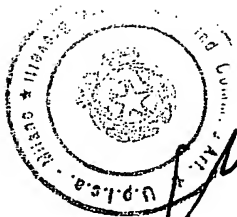
[Handwritten signature]

FIGURA 5



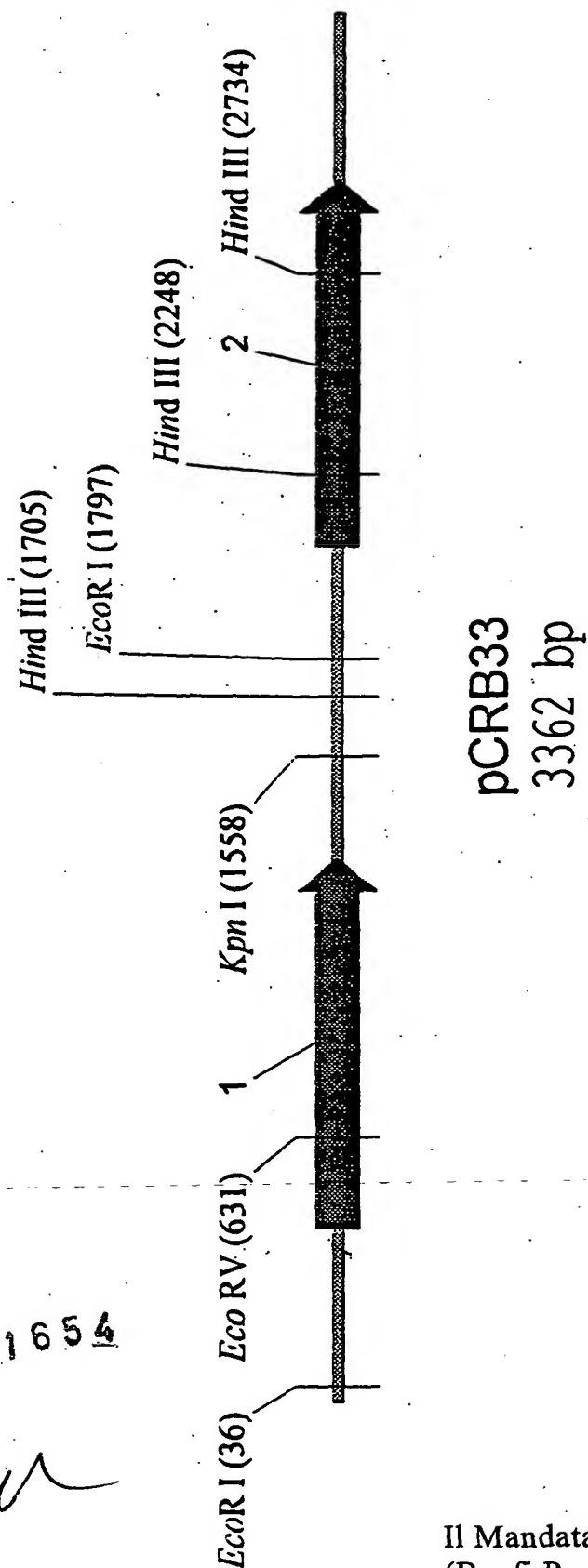
Il Mandatario
(Banfi Paolo)

di Bianchetti • Bracco • Minoja S.r.l.



MI 99 A 001654

FIGURA 6



M199 A001654

Il Mandatario
(Banfi Paolo)

di Bianchetti • Bracco • Minoja S.r.l.

